

MUTANT TYPE SECRETION DEVICE GENE THAT EFFICIENTLY SECRETS PROTEIN IN CELL BODIES OF CORYNEBACTERIUM

Patent number: JP11169182
Publication date: 1999-06-29
Inventor: KOBAYASHI MIKI; ASAI YOKO; YUGAWA HIDEAKI
Applicant: MITSUBISHI CHEMICAL CORP
Classification:
 - international: C12N15/09; C12N1/21; C12P21/02
 - european:
Application number: JP19970361768 19971210
Priority number(s):

Abstract of JP11169182

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the subject novel gene that comprises the DNA encoding a protein having a specific amino acid sequence in which the amino acid residue at a specific position is phenylalanine and can give a secretory device that can efficiently secrete a prescribed protein in the cell bodies of a Coryne form bacterium.
SOLUTION: This DNA encodes the protein having an amino acid sequence corresponding to formula I in which the amino acid residue at the 44 position is replaced with phenylalanine. The secretor that is constituted as including the above protein is a novel DNA that can more efficiently secrete the prescribed protein in Coryne form bacteria than the secretor that is constituted as including the protein having the amino acid sequence of formula II. This DNA is obtained by isolating the chromosomal DNA of a *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) through the hybridization technique using the oligo DNA probe and subjecting the isolated DNA to the site-specific mutation so that the amino acid at the 44-position becomes the residue of phenylalanine.

```

Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln N
1           5           10
Thr Tyr Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr A
20           25           30
Val Ser Gly Val Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Phe Glu Lys I
35           40           45
Thr Pro
50
  
```

```

Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln N
1           5           10
Thr Tyr Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr A
20           25           30
Val Ser Gly Val Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Val Glu Lys I
35           40           45
Thr Pro
50
  
```

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-169182

(43)公開日 平成11年(1999)6月29日

(51)IntCl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
		1/21
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	C
C 1 2 R 1:13)		

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-361768

(22)出願日 平成9年(1997)12月10日

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72)発明者 浅井 陽子

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(74)代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

(54)【発明の名称】 コリネ型細菌内で蛋白質を効率よく培地中へ分泌させる変異型分泌装置遺伝子

(57)【要約】

【課題】 コリネ型細菌由来の、所定の蛋白質を培地中へ効率よく分泌させるために必要な変異型分泌装置を構成する蛋白質をコードするDNAを提供する。

【解決手段】 配列番号2のアミノ酸配列における44位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基である配列番号2のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAであって、前記蛋白質を含んで構成される分泌装置は、コリネ型細菌内で、所定の蛋白質を、配列番号13のアミノ酸配列を有する蛋白質を含んで構成される分泌装置よりも効率よく分泌させるDNA。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2のアミノ酸配列における44位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基である配列番号2のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAであって、前記蛋白質を含んで構成される分泌装置は、コリネ型細菌内で、所定の蛋白質を、配列番号13のアミノ酸配列を有する蛋白質を含んで構成される分泌装置よりも効率よく分泌させるDNA。

【請求項2】 配列番号2のアミノ酸配列をコードする、請求項1に記載のDNA。

【請求項3】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)MJ-233である請求項1又は2記載のDNA。

【請求項4】 配列番号1の塩基配列を有する、請求項1～3のいずれかに記載のDNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載のDNAを導入した、組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載のDNAおよびコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを含む、請求項5に記載の組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項5又は6に記載の組換えプラスミドを保有するコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コリネ型細菌において、蛋白質の分泌を効率よく行わせる変異型分泌装置を構成する蛋白質をコードする遺伝子DNAに関する。本発明の変異型分泌装置遺伝子を保有するコリネ型細菌においては、工業的レベルにおいて所定の蛋白質を効率よく培地中へ分泌生産させることが可能である。

【0002】

【従来の技術】コリネ型細菌による蛋白質の分泌については今日まであまり研究が進んでいない。Corynebacterium glutamicumによるDNaseの分泌[米国特許第4965197号明細書]及びCorynebacterium glutamicumの細胞壁蛋白質であるPS1・PS2の分泌[国際公開第W093/03158号]に関する研究が報告されているにすぎない。また、コリネ型細菌由来の分泌装置(トランスロケーションマシナリー)を構成する主要因子についても、SecY[特開平6-169780号公報]、SecE[特開平6-277073号公報]及びSecA[特開平7-107981号公報]をコードする遺伝子を各々単離したという報告があるのみであり、系統的な研究は行われていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】これらの野生型の分泌装置を構成する主要因子を用いて分泌蛋白質の分泌量を増加させる試みは十分ではなく、工業的レベルで必要と

考えられている、野生型の装置を用いた場合の少なくとも2～3倍、望ましくは4倍以上の分泌量は達成されていない。

【0004】本発明は、工業的レベルにおいて、所定の蛋白質を培地中へ効率よく分泌させるために必要な変異型分泌装置をコードするコリネ型細菌由来のDNAの提供を目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌内で、所定の蛋白質を培地中へ効率よく分泌させるために必要な変異型分泌装置をコードする遺伝子DNAを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】かくして本発明によれば、配列番号2のアミノ酸配列における44位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基である配列番号2のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAであって、前記蛋白質を含んで構成される分泌装置は、コリネ型細菌内で、所定の蛋白質を、配列番号13のアミノ酸配列を有する蛋白質を含んで構成される分泌装置よりも効率よく分泌させるDNA(以下、本発明DNAともいう)、該DNAを導入した組換えプラスミド、及び、該プラスミドを保有するコリネ型細菌が提供される。

【0007】本発明DNAは、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列をコードする。具体的には、配列番号1の塩基配列を有するDNAが挙げられる。コリネ型細菌は、好ましくは、ブレヴィバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)MJ-233である。

【0008】組み換えプラスミドは、さらに、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを含むことが好ましい。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明DNAは、コリネ型細菌内で生産された所定の蛋白質を菌体外(例えば培地中)へ効率よく分泌生産させるために必要な分泌装置を構成する蛋白質をコードするものであって、コリネ型細菌の染色体上、もしくは染色体外に存在させることによって使用するものである。すなわち、本発明DNAは、染色体上、もしくは染色体外に存在し、分泌蛋白質前駆体のN末端配列を認識し、該分泌蛋白質を培地中に分泌生産させる分泌装置を構成する蛋白質の遺伝子を意味するものである。

【0010】本発明DNAがコードする蛋白質を含んで構成される変異型分泌装置は、蛋白質の分泌装置を構成する蛋白質群をコードする遺伝子DNA群の一つであるsecE遺伝子DNAがコードする蛋白質の代わりに本発明DNAがコードする蛋白質を含むものと考えられる。

【0011】本発明DNAは、コリネ型細菌から、se

cE遺伝子DNAを含むDNA断片（以下、これを「A断片」と略称することがある）を調製し、これに改変を加えることにより得ることができる。

【0012】A断片は、コリネ型細菌由来の染色体上からクローニングすることができ、その供給源となるコリネ型細菌としては、例えば、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*)、ATCC 6871、同ATCC 13745、同ATCC 13746、ブレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium devaricatum*) ATCC 14020、ブレビバクテリウム・ラクトファermenタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831等を用いることができる。

【0013】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである。A断片は、上記コリネ型細菌、例えば、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、染色体上にコードされる蛋白質遺伝子を単離する通常の方法、すなわち、大腸菌変異株を用いた相補、あるいは相同性領域のアミノ酸配列を基にデザインしたオリゴDNAプローブを用いたハイブリダイゼーション法により分離・取得することができる。

【0014】目的遺伝子を含む断片を単離し、単離した断片の塩基配列を決定することにより、全遺伝子断片を確認することができる。上記のA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、塩基配列が決定された後であれば、通常用いられるDNA合成装置、例えば、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNA シンセサイザーを用いて合成されたものであってもよい。

【0015】上記のようにして得られたA断片は、配列番号2に示すアミノ酸配列における44位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基となるように改変される。この改変は、部位特異的突然変異などの公知の方法によって塩基配列にヌクレオチドの置換、欠失、挿入などの変異を導入することによって生じさせることができる。

【0016】なお、本発明DNAは、その塩基配列が決定された後においては通常用いられるDNA合成装置を用いて合成することも可能である。本発明DNAがコードする蛋白質は、配列番号2のアミノ酸配列に相当する配列であって、配列番号2のアミノ酸配列における44位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基であるアミノ酸配列を有するという特徴を有し、コリネ型細菌内で、所定の蛋白質を、配列番号13のアミノ酸配列を有する蛋白質を含んで構成される分泌

装置よりも効率よく分泌させる分泌装置を構成し、好ましくは、工業的レベルにおいて、所定の蛋白質を培地中へ効率よく分泌させるために必要な変異型分泌装置を構成するものである。従って、本発明DNAがコードする蛋白質は、上記のような機能を実質的に損なうことがなく、工業的レベルにおいて培地中に所定の蛋白質を分泌生産可能ならしめるものであれば、配列番号2に示すアミノ酸配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たにアミノ酸残基が挿入されていてもよく、さらにアミノ酸残基の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体をコードするDNAのいずれもが、配列番号2のアミノ酸配列に相当する配列をコードするものとして本発明DNAに包含されるものである。

【0017】特に、配列番号2に示すアミノ酸配列と80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するものが好ましい。また、蛋白質の構造の一部を、自然又は人工の突然変異によって上記機能を実質的に変えずに変化させることも可能である。すなわち、本発明DNAのコードする蛋白質は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の同種変異型に相当する構造を有する蛋白質も包含する。また、通常の変異誘発法により変異を導入し、通常のスクリーニング法により分泌量を指標として選択を行うことにより得られ得る同等の配列も包含する。

【0018】本発明DNAの機能発現及び本発明DNAがコードする蛋白質を含んで構成される分泌装置の分泌の効率は、例えば後記実施例2に示すようにして、培地中に分泌される分泌蛋白質の活性等を測定することにより確認及び評価することができる。

【0019】使用する分泌蛋白質としては、例えば、アミラーゼが挙げられ、アミラーゼ遺伝子をコリネ型細菌染色体上、またはコリネ型細菌内で複製可能なプラスミドに挿入し、アミラーゼ活性を指標にしてその変異型分泌装置の分泌能を判定することができる。また、アミラーゼにとどまらず、プロテアーゼ、セルラーゼ、キシナーゼ、プルナーゼ、等、通常菌体外に分泌されるものはいずれも同様に使用することができる。なお、分泌される所定の蛋白質は、その分泌に分泌装置が関与している限り、特に制限はなく、これらの測定が容易な酵素蛋白質に限定されるものではない。

【0020】本発明DNAの具体例としては、配列番号1に示す塩基配列が挙げられる。本発明DNAを導入した組換えプラスミドは、通常に使用されるプラスミドに本発明DNAを常法に従って導入することによって得ることができる。例えば、特開平6-270073号公報に、secE遺伝子DNAを含むDNA断片について記載されているのと同様にして、本発明DNAを適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクタ

ーに導入することにより、コリネ型細菌内で、変異型分泌装置を構成する蛋白質を高発現することが可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0021】上記組換えプラスミドを保有するコリネ型細菌は、上記組換えプラスミドにより常法に従ってコリネ型細菌を形質転換することによって得ることができる。例えば、特開平6-270073号公報に、組換えプラスミドを保有するコリネ型細菌について記載されているのと同様にして得ることができる。

【0022】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

調製例1 評価用プラスミドの作製

(A) シャトルベクターの構築

米国特許第5185262号明細書記載のプラスミドpCRY31より、コリネ型細菌内でのプラスミドの安定化に必要な領域をPCR法により増幅させ、pBlue script IISK+ (TOYOBO社製) のEco*

反応液:

(10×) PCR緩衝液	10μl
1.25mM dNTP混合液	16μl
鋳型DNA	10μl (DNA含有量 1μM以下)
上記記載のa-1及びb-1プライマー	各々1μl (最終濃度0.25μM)
レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ	0.5μl (2.5 Unit)
滅菌蒸留水	61.5μl

以上を混合し、この100μlの反応液をPCRにかけた。

PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 94℃ 60秒

アニーリング過程: 52℃ 60秒

エクステンション過程: 72℃ 120秒

以上を1サイクルとし、25サイクル行った。

【0026】上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルによる電気泳動に付したところ、約1.1kbのDNA断片が検出できた。上記で増幅産物を確認できた反応液10μlおよびプラスミドpBlue script IISK+溶液1μlに各々制限酵素EcoRIおよびXhoIを加え、各溶液中のDNAを完全に切断し、次いで、70℃で10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ(10×)緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。

【0027】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法[Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)]によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製)を形質転換し、アンピシリン 50mgを含む培地[トリプトン 10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5g及び寒天 16gを蒸留水1Lに溶解]に塗抹した。

*RI, XhoIサイトにクローニングした。

【0023】プラスミドpCRY31内に存在する、コリネ型細菌内でのプラスミドの安定化に必要な領域の配列は決定されており、この配列をもとに、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer) を用いて合成した。

【0024】(a-1) 5'-TTT CTC GAG CCG ATT ACC TCC TTG CTA CTG-3' (配列番号3)

10 (b-1) 5'-TTT GAA TTC GAT ATC AAG CTT GCA CAT CAA-3' (配列番号4)

(配列中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミンを示す。)

【0025】PCRは、パーキンエルマーシータス社製のDNAサーマルサイクラーを用い、反応試薬としてレコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック (Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq) (宝酒造製)を用いて下記の条件で行った。

30 【0028】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpBlue script IISK+の長さ3.0kbのDNA断片に加え、長さ1.1kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpBSparと命名した。

【0029】次に、米国特許第5185262号明細書記載のプラスミドpCRY31より、コリネ型細菌内でのプラスミドの複製に必要な領域をPCR法により増幅させ、上記プラスミドpBSparのXhoI, KpnIサイトにクローニングし、シャトルベクターを作製した。

40 【0030】プラスミドpCRY31内に存在する、コリネ型細菌内でのプラスミドの複製に必要な領域の配列は決定されており、この配列をもとに、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer) を用いて合成した。

【0031】(a-2) 5'-TTT CGT ACC GAC TTA GAT AAA CGT CTA-3' (配列番号5)

(b-2) 5'-TTT CTC GAG TCG TCG TAA AAC AAC TTT-3' (配列番号6)

50 (配列中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミンを示す。)

【0032】PCRは、パーキンエルマーシータス社製のDNAサーマルサイクラーを用い、反応試薬としてレコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・*

*タック (Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq) (宝酒造製) を用いて下記の条件で行った。

反応液:

(10×) PCR緩衝液	10 μ l
1. 25 mM dNTP混合液	16 μ l
鋳型DNA	10 μ l (DNA含有量 1 μ M以下)
上記記載のa-2及びb-2プライマー	各々1 μ l (最終濃度0.25 μ M)
レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ	0.5 μ l (2.5 Unit)
滅菌蒸留水	61.5 μ l

以上を混合し、この100 μ lの反応液をPCRにかけた。

PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 94℃ 60秒

アニーリング過程: 52℃ 60秒

エクステンション過程: 72℃ 120秒

以上を1サイクルとし、25サイクル行った。

【0033】上記で生成した反応液10 μ lを0.8%アガロースゲルによる電気泳動に付したところ、約1.8 kbのDNA断片が検出できた。上記で増幅産物を確認できた反応液10 μ lおよびプラスミドpBSpar 20 溶液1 μ lに各々制限酵素Xho IおよびKpn Iを加え、各液中の核酸を完全に切断し、次いで、70℃で10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ(10×)緩衝液 1 μ l、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μ lにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。

【0034】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 15 30 9 (1970)] によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン 50 mgを含む培地 [トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g 及び寒天 16 gを蒸留水1 lに溶解] に塗抹した。

【0035】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpBSparの長さ4.1 kbのDNA断片に加え、長さ1.8 kbの挿入DNA断片が認め 40 られた。本プラスミドをpBSpar-repと命名した。

【0036】上記で作製したプラスミドpBSpar-rep溶液1 μ l、pHSG298 (宝酒造社製) 溶液1 μ lに各々制限酵素Kpn IおよびEcoRIを加え、各溶液中のDNAを完全に切断し、次いで、70℃※

反応液:

(10×) PCR緩衝液	10 μ l
1. 25 mM dNTP混合液	16 μ l
鋳型DNA	10 μ l (DNA含有量 1 μ M以下)

※で10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ(10×)緩衝液1 μ l、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μ lにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。

【0037】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 15 9 (1970)] によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換し、カナマイシン 50 mgを含む培地 [トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g 及び寒天 16 gを蒸留水1 lに溶解] に塗抹した。

【0038】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpHSG298の長さ2.6 kbのDNA断片に加え、長さ2.9 kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG298par-repと命名した。

【0039】(B) tacプロモーターの挿入プラスミドpTrc99Aを鋳型としたPCR法により、tacプロモーター断片を増幅させるべく、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer) を用いて合成した。

【0040】(a-3) 5'-TTT GGT ACC GAT AGC TTA CTC CCC ATC CCC-3' (配列番号7)

(b-3) 5'-TTT GGA TCC CAA CAT ATG AAC ACC TCC TTT TTA TCC GCT CACAAT TCC ACA CAT-3' (配列番号8)

(配列中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミンを示す。)

【0041】PCRは、パーキンエルマーシータス社製のDNAサーマルサイクラーを用い、反応試薬としてレコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック (Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq) (宝酒造製) を用いて下記の条件で行った。

上記記載のa-3及びb-3プライマー 各々1 μ l (最終濃度0.25 μ M)
 レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ 0.5 μ l (2.5 Unit)
 滅菌蒸留水 61.5 μ l

以上を混合し、この100 μ lの反応液をPCRにかけた。

PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 94 $^{\circ}$ C 60秒

アニーリング過程: 52 $^{\circ}$ C 60秒

エクステンション過程: 72 $^{\circ}$ C 120秒

以上を1サイクルとし、25サイクル行った。

【0042】上記で生成した反応液10 μ lを3%アガロースゲルによる電気泳動に付したところ、約100bpのDNA断片が検出できた。上記で増幅産物を確認できた反応液10 μ lおよび上記(A)で作製したプラスミドpHSG298par-repの溶液5 μ lに各々制限酵素BamHIおよびKpnIを加え、各溶液中のDNAを完全に切断し、次いで、70 $^{\circ}$ Cで10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ(10 \times)緩衝液 1 μ l、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μ lにして、15 $^{\circ}$ Cで3時間反応させ、結合させた。

【0043】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法[Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)]によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、カナマイシン 50mgを含む培地[トリプトン 10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5g及び寒天 16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0044】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミド

反応液:

(10 \times) PCR緩衝液 10 μ l

1.25mM dNTP混合液 16 μ l

鋳型DNA 10 μ l (DNA含有量 1 μ M以下)

上記記載のa-4及びb-4プライマー 各々1 μ l (最終濃度0.25 μ M)

レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ 0.5 μ l (2.5 Unit)

滅菌蒸留水 61.5 μ l

以上を混合し、この100 μ lの反応液をPCRにかけた。

PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 94 $^{\circ}$ C 60秒

アニーリング過程: 52 $^{\circ}$ C 60秒

エクステンション過程: 72 $^{\circ}$ C 120秒

以上を1サイクルとし、25サイクル行った。

【0049】上記で生成した反応液10 μ lを0.8%アガロースゲルによる電気泳動に付したところ、約1.3kbのDNA断片が検出できた。上記で増幅産物を確認できた反応液10 μ lおよび上記(B)で作製したプラスミドの溶液5 μ lに各々制限酵素NdeIおよびB

*Dを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記(A)作製のプラスミドの長さ5.5kbのDNA断片に加え、長さ0.1kbの挿入DNA断片が認められた。このプラスミドをpHSG298tacと命名した。

【0045】(C)アミラーゼ遺伝子の挿入

10 *Bacillus amyloliquefaciens*のアミラーゼ遺伝子の配列は決定されており[Journal of Biological Chemistry, 258, 1007-1013(1983)]、この遺伝子部分をPCR法により増幅させ、上記(B)で作製のプラスミドpHSG298tacに挿入し、評価用プラスミドを作製した。

【0046】下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製394 DNA/RNAシンセサイザー(synthesizer)を用いて合成した。

20 【0047】(a-4) 5'-TTT CAT ATG ATT CAA AAA CGA AAG-3' (配列番号9)

(b-4) 5'-TTT CGA TCC TTA TTT CTG AAC ATA-3' (配列番号10)

(配列中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミンを示す。)

【0048】PCRは、パーキンエルマーシータス社製のDNAサーマルサイクラーを用い、反応試薬としてレコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック(Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq)(宝酒造製)を用いて下記の条件で行った。

40 amHIを加え、各溶液中のDNAを完全に切断し、次いで、70 $^{\circ}$ Cで10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ(10 \times)緩衝液 1 μ l、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μ lにして、15 $^{\circ}$ Cで3時間反応させ、結合させた。

【0050】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法[Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)]によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、カナマイシン 50mgを含む培地[トリプトン 10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5g及び寒天 16gを蒸留水1

1に溶解]に塗抹した。

【0051】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記(B)作製のプラスミドの長さ5.6kbのDNA断片に加え、長さ1.3kbの挿入DNA断片が認められた。

【0052】このプラスミドをpSec1と命名した。

【0053】実施例1 コリネ型細菌由来分泌装置を構成する蛋白質の遺伝子DNA断片の改変

(A) コリネ型細菌由来分泌装置を構成する蛋白質の遺伝子DNA断片の単離

特開平6-169780号公報、特開平6-277073号公報、特開平7-107981号公報記載の方法に従って、コリネ型細菌由来の分泌装置を構成する主要因子SecY、SecE、SecAをコードする遺伝子を各々単離した。

【0054】(B) コリネ型細菌由来分泌装置を構成する蛋白質の遺伝子DNA断片の改変

前記(A)で調製したSecEをコードする遺伝子を含*20

反応液:

(10×) PCR緩衝液	10μl
1. 25mM dNTP混合液	16μl
鋳型DNA	10μl (DNA含有量 1μM以下)
上記記載のa-5及びb-5プライマー	各々1μl (最終濃度0.25μM)
100mM MnCl ₂	0.5μl
レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ	0.5μl (2.5 Unit)
滅菌蒸留水	59.5μl

以上を混合し、この100μlの反応液をPCRにかけた。

PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 94℃ 60秒

アニーリング過程: 52℃ 60秒

エクステンション過程: 72℃ 120秒

以上を1サイクルとし、25サイクル行った。

【0058】上記で生成した反応液10μlを3%アガロースゲルによる電気泳動に付したところ、約150bのDNA断片が検出できた。上記で増幅産物を確認できた反応液10μlおよび上記実施例1(C)で作製したプラスミドpSec1の溶液5μlに各々制限酵素BamHIおよびSseIを加え、各溶液中のDNAを完全に切断し、次いで、70℃で10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ(10×)緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。

【0059】一方、通常のPCRの条件にて野生型のsecE遺伝子を増幅させ、同様にして、プラスミドpSec1のBamHI、SseIサイトに挿入した。

【0060】(C) 分泌能を増加させる変異の同定

* ムプラスミドpUC118-secEを鋳型としてPCRを行うことにより、secE遺伝子断片を増幅させた。このときTaqポリメラーゼのフィデリティを下げるために、Mnイオンを反応液中に存在させ、変異をランダムに導入した断片を増幅させた。

【0055】下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製394 DNA/RNAシンセサイザー(synthesizer)を用いて合成した。

10 【0056】(a-5) 5'-TTT GGA TCC ATG GGA GAA GTC CGT AAG -3' (配列番号11)

(b-5) 5'-TTT CCT GCA GGC TAC GGA GTC AGA ATC TT -3' (配列番号12)

(配列中、Aはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、を示す。)

【0057】PCRは、パーキンエルマーシータス社製のDNAサーマルサイクラーを用い、反応試薬としてレコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック(Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq)(宝酒造製)を用いて下記の条件で行った。

実施例1(B)で作製した変異の導入されたsecE遺伝子、および野生型のsecE遺伝子を含むライゲーション液を米国特許第5185262号明細書記載の方法に従って、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1498)に導入した。

【0061】本菌体溶液を、コーンスターチを1%、カナマイシンを50μg/l含有するLB培地にまき、形成するハローのサイズの大きいものをピックアップした。このコロニーと、野生型のsecE遺伝子を用いて形質転換したコロニーより、常法に従い、プラスミドを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記調製例1(C)で作製されたプラスミドの長さ6.9kbのDNA断片に加え、長さ150bの挿入DNA断片が認められた。

40 【0062】変異型のsecE遺伝子の挿入されたプラスミドをpSec1Emt、野生型のsecE遺伝子の挿入されたプラスミドをpSec1Ewtと各々命名した。本プラスミドに挿入された変異型secE遺伝子のDNA塩基配列を決定した。決定された塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を下記配列表配列番号1に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。
50 その結果、野生型secE蛋白質の44番目のアミノ酸

ValがPheに変化していることが判明した。なお、野生型secE蛋白質のアミノ酸配列を配列番号13に示す。

【0063】実施例2 変異型分泌装置の評価

pSecLEmt、pSECLEwtプラスミドを米国特許第5185262号明細書記載の方法に従って、ブレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1498)に導入した。

【0064】形質転換されたブレバクテリウム・フラバムMJ-233菌体を、白金耳にて10mlの半合成培地A培地〔組成：尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、及び、グルコース 20gを蒸留水 1lに溶解した〕に植菌し、30 \sim 33 $^{\circ}\text{C}$ で12 \sim 16時間振とう培養（前培養）した。次にA培地100mlに前培養液を2%植菌し、31 $^{\circ}\text{C}$ で5時間振とうした後集菌し、アミラーゼ活性測定用培養液とした。

【0065】アミラーゼ活性の測定は市販のアミラーゼ活性測定キット〔アミラーゼ B-テストワコー（和光純薬社製）〕添付のプロトコールに従って行った。アミラーゼ活性測定の結果、pSecLEwtを導入した菌体に比較して、pSecLEmtを導入した菌体の培養*

配列

GTG GGA GAA GTC CGT AAG GTT ATT TGG CCT ACT GCG CGC CAG ATG GTC	48
Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val	
1 5 10 15	
ACG TAC ACC CTT GTG GTT TTG GGA TTT TTG ATT GTT TTG ACC GCT TTG	96
Thr Tyr Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu	
20 25 30	
GTG TCT CGT GTG GAT TTC CTA GCT GGT CTT GGA TTT GAG AAG ATT CTG	144
Val Ser Gly Val Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Phe Glu Lys Ile Leu	
35 40 45	
ACT CCG TAG	153
Thr Pro	
50	

【0068】配列番号：2

配列の長さ：50

配列の型：アミノ酸

配列

Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val	
1 5 10 15	
Thr Tyr Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu	
20 25 30	
Val Ser Gly Val Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Phe Glu Lys Ile Leu	
35 40 45	
Thr Pro	
50	

* 上清中の活性は約5倍に上昇しており、配列番号1記載の塩基配列からなるA断片の活性が著しく高いことを確認した。

【0066】

【発明の効果】コリネ型細菌由来の、所定の蛋白質を培地中へ効率よく分泌させるために必要な変異型分泌装置を構成する蛋白質をコードするDNAが提供され、所定の蛋白質を培地中へ効率よく分泌生産させる系の構築、製造法の確立が可能となった。

【0067】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：153

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレバクテリウム フラバム(Brevibacterium flavum)

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..150

特徴を決定した方法：E

※トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：ペプチド

※

15
【0069】配列番号：3
配列の長さ：30
配列の型：核酸

配列

TTTCTCGAGC GCATTACCTC CTGCTACTG

【0070】配列番号：4
配列の長さ：30
配列の型：核酸

配列

TTTGAATTCG ATATCAAGCT TGCACATCAA

【0071】配列番号：5
配列の長さ：27
配列の型：核酸

配列

TTTGGTACCG ACTTAGATAA AGGTCTA

【0072】配列番号：6
配列の長さ：27
配列の型：核酸

配列

TTTCTCGAGT GCTGGTAAAA CAACCTT

【0073】配列番号：7
配列の長さ：30
配列の型：核酸

配列

TTTGGTACCG ATAGCTTACT CCCCATCCCC

【0074】配列番号：8
配列の長さ：54
配列の型：核酸

配列

TTTGGATCCC AACATATGAA CACCTCCTTT TTATCCGCTC ACAATTCCAC ACAT

【0075】配列番号：9
配列の長さ：24
配列の型：核酸

配列

TTTCATATGA TTCAAAACG AAAG

【0076】配列番号：10
配列の長さ：24
配列の型：核酸

配列

TTTGGATCCT TATTTCTGAA CATA

【0077】配列番号：11
配列の長さ：27
配列の型：核酸

配列

TTTGGATCCA TGGGAGAAGT CCGTAAG

【0078】配列番号：12
配列の長さ：29
配列の型：核酸

配列

TTTCCTGCAG GCTACGGAGT CAGAATCTT

※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：その他 合成DNA

※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：その他 合成DNA

★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：その他 合成DNA

☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：その他 合成DNA

◆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 配列の種類：その他 合成DNA

※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：その他 合成DNA

※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：その他 合成DNA

★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：その他 合成DNA

☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：その他 合成DNA

◆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 配列の種類：その他 合成DNA

(10)

特開平11-169182

17

18

【0079】配列番号：13

*トポロジー：直鎖状

配列の長さ：50

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

*

配列

Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val

1 5 10 15

Thr Tyr Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu

20 25 30

Val Ser Gly Val Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Val Glu Lys Ile Leu

35 40 45

Thr Pro

50

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)